

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR04/003364

International filing date: 23 December 2004 (23.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0315327
Filing date: 24 December 2003 (24.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 18 March 2005 (18.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 14 JAN. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'M. Planche', enclosed within a large, loopy oval stroke.

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 © W / 210502

REMISE DES PIÈCES

DATE

24 DEC 2003

LIEU

13 INPI MARSEILLE

N° D'ENREGISTREMENT

0315327

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

24 DEC. 2003

Vos références pour ce dossier

(facultatif) H52 781 CAS 1 FR / MD

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET BEAU DE LOMENIE
232, Avenue du Prado

13295 MARSEILLE CEDEX 08

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de
brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Méthode de diagnostic sérologique des maladies infectieuses par immunodétection d'antigène microbien
comportant le contrôle de réaction faussement positive ou négative

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale

☐ Personne physique

Nom
ou dénomination sociale

INODIAG

Prénoms

Forme juridique

ano s.a. à conseil d'administration

N° SIREN

4 4 8 4 4 4 4 3 0

Code APE-NAF

Domicile
ou
siège

Rue

27 bd Jean Moulin
Faculté Médecine de la Timone

Code postal et ville

1 3 0 0 5 MARSEILLE

Pays

FRANCE

Nationalité

FRANCAISE

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Remplir impérativement la 2^{ème} page

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
 page 2/2

BR2

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

24 DEC 2003

LIEU

13 INPI MARSEILLE

N° D'ENREGISTREMENT

0315327

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)

Nom

PORTAL

Prénom

Gérard

Cabinet ou Société

Cabinet BEAU DE LOMENIE

N° de pouvoir permanent et/ou
de lien contractuel

92-1203

Adresse

Rue

232 avenue du Prado

Code postal et ville

13 295 MARSEILLE CEDEX 08

Pays

FRANCE

N° de téléphone (facultatif)

04 91 76 55 30

N° de télécopie (facultatif)

04 91 77 97 09

Adresse électronique (facultatif)

7 INVENTEUR (S)**Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques**Les demandeurs et les inventeurs
sont les mêmes personnes☐ Oui☒ Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)**8 RAPPORT DE RECHERCHE****Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)**Établissement immédiat
ou établissement différé☒☐Paiement échelonné de la redevance
(en deux versements)**Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt**☐ Oui☐ Non**9 RÉDUCTION DU TAUX
DES REDEVANCES****Uniquement pour les personnes physiques**☐ Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)☐ Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG**10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES
ET/OU D'ACIDES AMINÉS**☐ Cochez la case si la description contient une liste de séquences

Le support électronique de données est joint

☐La déclaration de conformité de la liste de
séquences sur support papier avec le
support électronique de données est jointe☐Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite»,
indiquez le nombre de pages jointes
VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI
**11 SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE**

(Nom et qualité du signataire)

Gérard PORTAL

CPI n° 92-1203

METHODE DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DES MALADIES
INFECTIEUSES PAR IMMUNODETECTION D'ANTIGENE
MICROBIEN COMPRENANT LE CONTROLE DE REACTION
FAUSSEMENT POSITIVE OU NEGATIVE

5 La présente invention concerne une méthode de diagnostic
des maladies infectieuses humaines et animales. Plus
particulièrement, elle concerne le domaine du diagnostic des
maladies infectieuses humaines et animales par sérologie
microbienne. Il s'agit d'une méthode de diagnostic indirect qui
10 repose sur la recherche dans le sérum du patient d'anticorps
spécifiques de l'agent microbien infectieux, à savoir une bactérie,
un virus, un parasite ou un champignon responsable d'une
pathologie (désignés ci-dessous "microbe").

Dans la présente invention, le terme de "patient" est pris au
15 sens large, incluant les patients humains et également les
animaux. On entend, plus particulièrement, par "animal" :

- les oiseaux, plus particulièrement encore les volailles que
l'on élève pour leurs œufs ou leur chair, et

- les mammifères, notamment chiens, chats, chevaux, bovins
20 tels que veaux, vaches , ovins tels que moutons, et caprins tels
que chèvres.

Cette méthode de diagnostic est primordiale pour le
diagnostic des infections à microbes, de prélèvement, de culture
et/ou d'identification difficile, en particulier les virus et les
25 bactéries intracellulaires strictes et les bactéries intracellulaires
facultatives des genres *Rickettsia*, *Coxiella*, *Bartonella*,
Tropheryma, *Ehrlichia*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Treponema*,
Borrelia, et *Leptospira* par exemple, pour lesquels on utilise,
comme antigènes microbiens, des antigènes constitués de

microbes entiers ou de fractions ou fragments de microbes comprenant un ou plusieurs antigènes. Il est en effet possible de fragmenter mécaniquement le microbe par agitation mécanique ou par sonication par exemple ou bien de fragmenter le microbe par un procédé enzymatique afin d'en obtenir une fraction conservant les antigènes qui supportent la réaction sérologique, objet de la présente invention. Les fractions ainsi obtenues sont séparées ou encore purifiées des autres constituant du microbe et de son milieu de culture par un procédé approprié, par exemple par centrifugation ou par filtration. On parle alors de fraction antigénique ou d'antigène purifié. Le microbe entier ou une quelconque fraction du microbe est appelé ci-après "antigène particulaire ou corpusculaire" en ce que le microbe entier ou une de ses fractions ne peut pas être mis en solution par dissolution, mais uniquement en suspension dans un fluide approprié. Les microbes ou leur fraction restent visibles en tant que particules individualisables par observation microscopique à l'aide d'un microscope optique ou d'un microscope électronique par exemple.

Techniquement, la sérologie microbienne consiste à détecter dans le sérum du patient une réaction antigène – anticorps dans laquelle l'antigène est représenté par tout ou fraction de l'agent microbien infectieux à détecter et l'anticorps est représenté par les immunoglobulines humaines ou animales spécifiques dudit agent microbien infectieux présentes dans le sérum du patient. Elle peut être quantifiée en testant successivement une série de dilutions croissantes de raison 2 ou de raison 10 du sérum du patient à partir d'une première dilution au 1 :16 ou bien au 1 :50 du sérum du patient.

Classiquement, une méthode de diagnostic sérologique comporte plus particulièrement le dépôt de l'antigène sur un support solide tel que des microbilles de latex, notamment dans la

technique de détection par agglutination dans laquelle des microbilles de latex sont recouvertes par l'antigène microbien à tester, et sont agglutinées les unes aux autres par le sérum de patient présentant des anticorps spécifiques, cette agglutination
5 étant visible à l'œil nu.

Toutefois, la technique de détection par test d'agglutination est à la fois peu pratique à mettre en œuvre et peu sensible. Elle implique, en outre, l'utilisation de quantités importantes de réactifs et du sérum du patient et, enfin, la lecture des résultats n'est pas
10 automatisable. Ce test de détection par agglutination ne peut donc pas être mis en œuvre dans le cas de tests à pratiquer en série sur un grand nombre de sérums.

Selon la méthode de l'invention, on dépose donc, le cas échéant, l'antigène sur un support solide du type lame de verre, ou
15 microplaque de titration pour mettre en œuvre des techniques de détection par immunodétection, notamment immunofluorescence, ou par technique enzymatique, notamment du type ELISA "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" ou une feuille de nitrocellulose ou de nylon pour les techniques de détection du type Western-blot,
20 dans laquelle les antigènes microbiens séparés par électrophorèse puis transférés sur le support solide (feuille de nitrocellulose ou de nylon) réagissent séparément les uns des autres avec le sérum du patient. Ces techniques de détection sont bien connues de l'homme de l'art, et comprennent les étapes successives de :

25 1. décomplémentation du sérum par chauffage à 56°C pendant 30 minutes,

2. mise en contact de l'antigène correspondant à l'agent microbien infectieux fixé sur support solide, avec le sérum du patient puis incubation sous des conditions de temps, de

température, d'hygrométrie, d'agitation mécanique et de force ionique du milieu permettant la réaction antigène – anticorps,

3. lavage précautionneux et extensif permettant d'éliminer le sérum du patient non-fixé au support solide, en excès ,

5 4. application d'un anticorps secondaire de détection qui est une immunoglobuline animale dirigée contre les immunoglobulines de l'espèce du patient considéré, par exemple dans le cas d'un patient humain une immunoglobuline de chèvre anti-immunoglobuline humaine conjuguée à une substance
10 fluorochrome, généralement de l'iso-thio-cyanate de fluoresceine ou une enzyme, généralement une peroxydase et incubation sous des conditions de temps, de température, d'hygrométrie, d'agitation mécanique et de force ionique du milieu permettant la réaction antigène – anticorps,

15 5. lavage précautionneux et extensif permettant d'éliminer l'immunoglobuline marquée, non fixée, en excès,

6. détection d'une réaction par lecture, à l'aide d'un appareillage approprié en fonction du marqueur tel qu'un microscope à fluorescence ou un lecteur de puces biologiques
20 (microarray en anglais) pour la technique d'immunofluorescence indirecte, ou un lecteur de densité optique pour la technique de détection enzymatique du type ELISA. La lecture de la réaction Western-Blot se fait à l'œil nu ou après acquisition numérique du gel et analyse par un logiciel de densitométrie ou tout logiciel
25 approprié pour le traitement des images.

La présente invention concerne plus particulièrement les méthodes de détection et dosage dans lesquelles on détecte la présence et, de préférence, on dose la quantité d'immunoglobulines de classe M (IgM) et G(IgG) spécifiques d'un

antigène microbien caractéristique d'un microbe. Ces déterminations donnent des informations plus précises et complètes, nécessaires pour établir l'étiologie et suivre l'évolution de certaines maladies infectieuses. Ainsi, en général les IgM
5 apparaissent de façon plus précoce. Quant aux IgG, elles permettent d'établir le statut sérologique du patient vis à vis d'un microbe donné, en vue d'établir le diagnostic sérologique de l'infection ou d'établir le degré de protection de l'organisme contre ce microbe.

10 Dans ces méthodes on utilise deux types d'anticorps secondaires de détection marqués par des marqueurs différents, en général des immunoglobulines animales dirigées contre les immunoglobulines de l'espèce du patient considéré, par exemple dans le cas d'un patient humain une immunoglobuline de chèvre
15 anti-immunoglobuline humaine anti IgM et anti IgG humaines qui réagissent avec les immunoglobulines spécifiques de classe M ou G complexées au dit antigène microbien.

La spécificité de la réaction antigène infectieux/anticorps sérique conditionne la spécificité et la valeur prédictive positive du
20 test sérologique basé sur cette réaction et toute fixation d'un anticorps non-spécifique sur l'antigène microbien limite la spécificité et la valeur prédictive du test sérologique. La présence dans le sérum à tester, de facteurs rhumatoïdes ou d'anticorps anti-nucléaires, est une source de fixation non-spécifique
25 d'anticorps sur l'antigène microbien comme expliqué ci-après.

Chez l'homme, les facteurs rhumatoïdes ont été initialement décrits par Waller [Waller E. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1940, 17:172-8] et Rose et coll. [Rose H.M., Ragan C., Pearce E., Lipmann M.O. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1948, 68:1-11] comme
30 des immunoglobulines du sérum de patient présentant une polyarthrite rhumatoïde, capables d'agglutiner des érythrocytes de

mouton recouverts par une immunoglobuline de classe G (IgG) de lapin. Il a ensuite été montré que certains de ces facteurs rhumatoïdes sont des immunoglobulines de classe M (IgM) reconnaissant le fragment Fc des IgG de différentes espèces dont
5 les IgG humaines.

Plusieurs modifications de la réaction de Waller et Rose ont aboutit à la commercialisation de tests de détection des facteurs rhumatoïdes utilisant une méthode d'agglutination de billes de latex recouvertes par des IgG [Singer J.M. Plotz C.M. Am. J. Med.
10 1956; 21 :888-92]. La prévalence des facteurs rhumatoïdes détectés par agglutination est de 3.3% (pour un titre > 1 :20) [Mikkelsen W.M. et al. J. Chron. Dis. 1967, 20 :351-69]. La présence de facteurs rhumatoïdes dans le sérum d'un patient - plus importante chez les patients âgés - est responsable de résultats
15 faussement positifs lors de la détection d'IgM spécifiques d'un antigène microbien au cours des tests sérologiques pour le diagnostic indirect des maladies infectieuses [Fuccillo D.A. et al. Manual of Clinical Laboratory Immunology Fourth Edition, Rose N.R., Conway de Macaria E., Fahey J.L., Friedman H., Penn G.M.
20 editors, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1992, 545-53]. En effet, ces facteurs rhumatoïdes se fixent aux IgG spécifiques de l'antigène microbien contenu dans le sérum du patient, et apparaissent donc faussement positifs lors de la détection des IgM spécifiques dans la réaction sérologique utilisant
25 l'antigène microbien dans des tests de détection par agglutination. [Relmer C.B. et al. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1975, 254 :77-93].

Il est possible d'éliminer les facteurs rhumatoïdes du sérum par une adsorption par des IgG humaines non spécifiques que l'on introduit en excès dans l'échantillon. Ces IgG introduites sont
30 modifiées par chauffage ou traitement par le glutaraldéhyde de façon à ce qu'elles n'interfèrent pas avec la détection des IgG

spécifiques. Cet ajout d'IgG provoque une précipitation après complexation avec les substances anti IgG contenues dans l'échantillon. Mais, dans ce cas, les IgG et IgM spécifiques contenues dans l'échantillon peuvent aussi être dénaturées par le
5 traitement de modification des IgG introduites dans l'échantillon.

Il est également possible d'éliminer les IgM totales du sérum avec la protéine A du *Staphylococcus aureus* ou avec des anticorps hétérologues (de mouton, par exemple) dirigés contre les IgM humaines. Mais, dans ce cas, la formation des complexes
10 anticorps hétérologues-IgG humain entraîne à la fois l'adsorption des facteurs rhumatoïdes et des IgM spécifiques de l'antigène microbien.

Bien que l'adsorption systématique des facteurs rhumatoïdes soit recommandée avant la détection sérologique des IgM
15 spécifiques d'un microbe, il n'existe pas, à ce jour, de contrôle systématique de l'efficacité de cette adsorption avant la mise en œuvre de la réaction sérologique.

De même, la présence dans le sérum du patient d'anticorps anti-nucléaires limite la spécificité de la réaction antigène
20 microbien-anticorps sériques. Les anticorps anti-nucléaires sont en effet des anticorps du type IgG dirigés de façon non-spécifique contre l'ensemble formé par l'ADN et les protéines nucléaires du chromosome des cellules eucaryotes et des microbes, appelées histones. Ces anticorps anti-nucléaires se fixent donc de façon
25 non-spécifique sur toute cellule eucaryote y compris les champignons et les parasites et sur tout microbe, bactérie, virus à ADN, parasite ou champignon. Ce phénomène entraîne une réaction positive non-spécifique au cours des tests sérologiques utilisant la détection d'IgG spécifique d'une bactérie, un virus à
30 ADN, un champignon ou un parasite entier ou comprenant des complexes ADN/histones comme antigène microbien à l'aide

d'anticorps de détection anti IgG dans un sérum contenant des anticorps anti-nucléaires.

La détection des anticorps anti-nucléaires dans le sérum à tester, réalisée en utilisant une technique d'immunodétection par immunofluorescence, a été décrite [Fritzler M.J. In : Manual of
5 Clinical Laboratory Immunology, Fourth edition, Rose N.R., Conway de Macario E., Fahey J.L., Friedman H., Penn, G.M., (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1992, pp. 724-729] utilisant des cellules mammifères y compris des cellules
10 humaines telles que des cellules Hep-2 comme antigène. Dans ces conditions, la prévalence des anticorps antinucléaires détectés sur le sérum pur est de 2% dans la population générale, de 20% parmi les parents de patients présentant une polyarthrite rhumatoïde, et de 75% parmi les personnes âgées sans pathologie clinique
15 apparente [Mc Carty G.A., and coll. Antinuclear antibodies : contemporary techniques and clinical applications to connective tissue diseases. Oxford University Press, New-York, 1984]. Dans cette méthode, les cellules sont constituées par un tapis de cellules confluentes déposées et « lues » manuellement. Ce dépôt
20 de cellules confluentes est trop visqueux pour être robotisable par dépôt avec un robot de type seringue, et la lecture n'est pas automatisable car, seul, le dépôt manuel permet de déposer une grande quantité de cellules de manière à garantir une détection suffisante de la réaction Cellule-anticorps anti-nucléaires. Dans
25 ces publications, on ne mentionne pas la nécessité de réaliser un contrôle systématique de la présence d'anticorps anti-nucléaires dans des tests d'immunodétection d'antigènes microbiens. En outre, la détection avec des cellules confluentes déposées manuellement sur support solide n'est pas applicable pour des
30 tests de routine de laboratoire.

Il n'y a donc pas de méthode publiée à ce jour, pour le contrôle ou l'élimination des anticorps anti-nucléaires avant la réalisation d'un test sérologique pour le diagnostic des maladies infectieuses de façon à garantir lors du résultat l'absence d'une
5 réaction faussement positive applicable en routine de laboratoire. C'est pourquoi, aucun protocole de sérologie publié dans les manuels de référence ni aucun test sérologique commercialisé n'inclut systématiquement le dépistage d'anticorps anti-nucléaires ni de facteur rhumatoïde comme préalable à la réalisation ou à
10 l'interprétation de la sérologie.

En pratique, à ce jour, dans les tests d'immunodétection en routine de laboratoire, on ne peut, tout au plus, détecter les faux positifs dus à la présence de facteur rhumatoïde (ou anticorps anti-nucléaires qu'en effectuant des tests sur une pluralité d'antigènes
15 microbiens dont la présence concomitante n'est pas vraisemblable. Mais, ce type de vérification, on le comprend, augmente considérablement le coût en terme de matériel et main d'œuvre ainsi que la durée des tests.

On connaît des méthodes et kit de diagnostic impliquant
20 l'utilisation d'un support solide sur lequel sont fixés de façon covalente des protéines solubles, mais ces couplages chimiques covalents sont complexes et coûteux à réaliser. On a proposé la fixation non covalente de protéine soluble ou antigène particulaire sur support solide par adsorption physique ou physico-chimique sur
25 le support, dans le cadre des protocoles de tests d'immunodétection sur support solide, mais la stabilité de la fixation est insuffisante. Une difficulté tient à ce qu'il est nécessaire de bien laver préalablement le support solide pour éliminer les résidus d'éléments de marquage pouvant interférer
30 avec la lecture des résultats alors que ces lavages rendent l'adsorption physique des substances sur le support solide trop

instable. Une autre difficulté tient à ce qu'il est pas possible de déposer avec des robots de dépôts des antigènes corpusculaires qu'il s'agisse de cellules ou bactéries entières ou partielles comme mentionné ci-dessus.

5 Un premier but de la présente invention est de fournir un test fiable d'immunodétection d'antigènes microbiens, notamment d'antigènes particuliers, par une méthode et des outils simples à mettre en œuvre et réaliser pour une application en routine de laboratoire dans le cadre de la réalisation des tests en série, dans
10 le cas où le sérum testé pourrait contenir des facteurs rhumatoïdes ou des anticorps anti-nucléaires.

 Un autre but de la présente invention est de fournir une méthode de préparation de support solide permettant un dépôt robotisé et fixation non covalente par adsorption physique sur le
15 support d'antigènes témoins de la présence de facteur rhumatoïde et anticorps anti-nucléaire et antigène microbien, constitués de protéines ou d'antigènes particuliers comme expliqué ci-dessus, ainsi que la lecture automatisée du contrôle d'absence de facteur rhumatoïde et d'anticorps anti-nucléaires et du résultat de la
20 réaction immunologique dans un test de sérum de patient impliquant une réaction de sérologie microbienne des IgM ou bien des IgG spécifiques par adsorption avec l'antigène microbien particulaire ou corpusculaire déposé sur support solide.

 De même, aucun test sérologique commercialisé n'inclut
25 systématiquement le contrôle de l'introduction et de la valeur réactive (ou réactivité immunologique) des anticorps secondaires de détection anti IgM ou anti IgG mis en œuvre, et un autre but original de la présente invention est de fournir un test comprenant ce contrôle de réactivité.

Pour ce faire, la présente invention fournit une méthode de diagnostic sérologique in vitro d'agent microbien par immunodétection dans laquelle on détecte la présence et, de préférence, on dose la quantité d'immunoglobulines de patient, notamment humaines pour un patient de l'espèce humaine, de classe M spécifiques d'un antigène microbien caractéristique du dit agent microbien, dans un échantillon de sérum de patient à tester, notamment humain, par détection et, de préférence, quantification d'un complexe de réaction immunologique entre ledit antigène microbien à détecter et une dite immunoglobuline spécifique de classe M, à l'aide d'une première substance de détection comprenant un premier élément de marquage, de préférence un premier anticorps de marquage, ne réagissant qu'avec une dite immunoglobuline de classe M, de l'espèce du patient, notamment humaine, caractérisée en ce que l'on contrôle la présence éventuelle de facteur rhumatoïde dans ledit échantillon à tester en mettant en contact ledit échantillon à tester avec un support solide sur lequel a été fixé un premier antigène correspondant à une immunoglobuline non spécifique de classe G, de préférence une immunoglobuline de l'espèce du patient notamment humaine, la mise en contact se faisant en présence de ladite première substance de détection, et on vérifie si ladite immunoglobuline non spécifique de classe G fixée sur le support solide, a réagi avec ladite première substance de détection.

Si l'échantillon comprend des facteurs rhumatoïdes (IgM anti IgG), ceux-ci peuvent réagir avec les immunoglobulines (IgG₁) fixées sur le support solide, sous forme du complexe suivant avec ladite première substance de détection (Ac₁ anti IgM*¹) : (S-IgG₁-IgM anti IgG - Ac₁ anti IgM*¹).

Quand l'absence de facteur rhumatoïde est établie, la détection d'une réaction entre ladite première substance de

détection et ledit antigène microbien (Agmic) est effectivement la preuve de la présence dans le sérum testé d'immunoglobulines de classe M spécifique de l'antigène microbien (IgM anti Agmic) par formation du complexe (S-Agmic-IgM anti Ag-Ac₁ anti IgM*¹), et
5 non pas de la présence d'IgG spécifique du dit antigène microbien (IgG anti Agmic), lesquels pourraient en effet former, en présence de facteur rhumatoïde, un complexe faux positif (S-Agmic-IgG anti Agmic-IgM anti IgG - Ac₁ anti IgM*¹).

En outre comme explicité ci-après, lorsque ledit premier
10 antigène est constitué d'une IgG de l'espèce du patient notamment humaine, ceci permet de vérifier la présence et la réactivité d'une seconde substance de détection reconnaissant spécifiquement les IgG du sérum de l'espèce du patient.

Avantageusement, dans une méthode de diagnostic selon
15 l'invention on détecte en outre et, de préférence, on dose la quantité d'immunoglobuline du patient, notamment humaine, de classe G spécifique d'un dit antigène microbien, par détection et, de préférence, quantification d'un complexe de réaction immunologique entre ledit antigène microbien et d'une dite
20 immunoglobuline spécifique de classe G, à l'aide d'une seconde substance de détection comprenant un second élément de marquage, de préférence un second anticorps de marquage comprenant un second élément de marquage différent du dit premier élément de marquage, ladite deuxième substance de
25 détection ne réagissant qu'avec une dite immunoglobuline, notamment humaine, de classe G de l'espèce du patient caractérisée en ce que l'on contrôle la présence éventuelle d'anticorps anti-nucléaire dans ledit échantillon à tester en mettant en contact ledit échantillon à tester avec un support solide sur
30 lequel a été fixé un deuxième antigène comprenant des complexes ADN/histones, de préférence comprenant des noyaux de cellules

nucléées de l'espèce du patient, notamment humaines, de préférence encore, tout ou partie de cellules d'origine de l'espèce du patient, notamment humaines, en lignée continue, et on vérifie si ladite deuxième substance de détection a réagi avec ledit
5 deuxième antigène fixé sur le support solide.

Dans le cas d'un patient humain, on peut, notamment, utiliser des cellules de fibroblastes humains non confluentes en suspension, notamment des cellules HL60.

Si l'échantillon à tester comprend des anticorps anti-
10 nucléaires (qui sont des IgG, notamment humaines), ceux-ci peuvent réagir avec ledit deuxième antigène (Ag_2) et être détectés par ladite deuxième substance de marquage (Ac_2 anti IgG^{*2}) puisque celle-ci est une substance réagissant avec des IgG de l'espèce du patient, notamment humaines, et former le complexe
15 ($S-Ag_2-IgG$ anti $Ag_2- Ac_2$ anti IgG^{*2}).

Si, en outre, on détecte sur le support solide sur lequel est fixé ledit premier antigène (IgG_1), un complexe entre ledit premier antigène et ladite seconde substance de marquage, à savoir nécessairement un complexe ($S-IgG_1- Ac_2$ anti IgG^{*2}), ceci permet
20 de confirmer l'absence de facteur rhumatoïde.

La détection d'une réaction entre ladite première substance de détection et ledit deuxième antigène (Ag_2) fixé sur support solide, signifie nécessairement que s'est formé un complexe avec des anticorps anti-nucléaires (Ac anti nucl.) suivant : ($S-Ag_2-IgG$
25 anti nucl.- IgM anti $IgG- Ac_1$ anti IgM^{*1}), et donc que l'échantillon comprend à la fois le facteur rhumatoïde et des anticorps anti-nucléaire.

Une fois l'absence d'anticorps anti-nucléaire établie, la détection d'une réaction de ladite seconde substance de marquage

avec ledit antigène microbien est bien la preuve de la présence d'IgG spécifique du dit antigène microbien et de formation d'un complexe (S-Agmig-IgG antiAgmic-Ac₂ anti IgG*²) et non pas d'un complexe faux positif résultant de la réaction des anticorps anti-
5 nucléaires avec l'antigène microbien selon le complexe (S-Agmig-Ac anti nucl.-Ac₂ anti IgG*²).

De préférence, lorsque l'on détecte la présence d'immunoglobulines du patient, notamment humaines, de classe G spécifiques d'un dit antigène microbien à l'aide d'une dite seconde
10 substance de détection comprenant un deuxième élément de marquage. On réalise un contrôle de la présence et de la réactivité de ladite seconde substance de détection en mettant en contact ledit support solide, sur lequel a été fixé ledit premier antigène correspondant à une dite immunoglobuline de l'espèce du patient,
15 notamment humaine, non spécifique de classe G, avec une solution contenant un dit second anticorps de marquage anti IgG et ne contenant pas de facteur rhumatoïde, et en vérifiant si la dite seconde substance de détection a réagi avec ledit premier antigène fixé sur le support solide.

20 De préférence encore, on vérifie la réactivité de ladite deuxième substance de détection introduite dans ledit échantillon de sérum à tester, après avoir vérifié l'absence de facteur rhumatoïde et d'anticorps anti-nucléaires dans ledit échantillon .

Si ladite deuxième substance de détection est bien réactive
25 en l'absence de facteur rhumatoïde, on doit détecter le complexe suivant (S-IgG₁-Ac₂ anti IgG*²) avec ledit premier antigène (IgG₁). Dans ce cas, l'absence de réaction de ladite deuxième substance de détection avec ledit deuxième antigène est bien la preuve de l'absence d'anticorps anti-nucléaires.

Dans un mode de réalisation avantageux, on réalise un contrôle de la présence et de la réactivité de ladite première substance de marquage qui est un anticorps anti-immunoglobuline M de l'espèce du patient, notamment humaine, en mettant en
5 contact un support solide sur lequel est fixée un troisième antigène correspondant à une immunoglobuline de l'espèce du patient, notamment humaine, non spécifique de classe M (IgM_1), avec une solution contenant une dite première substance de marquage et ne contenant pas de facteur rhumatoïde, et en vérifiant si ladite
10 première substance réagit avec ledit troisième antigène fixé sur le support solide.

Si ladite première substance de détection est présente et est bien réactive, on doit détecter un complexe $S-IgM_1-Ac_1$ anti IgM^{*1} . Ainsi, l'absence de détection d'un complexe comprenant ledit
15 premier marqueur au niveau du dit premier antigène (IgG_1) et, le cas échéant, au niveau du dit second antigène fixé sur support solide, est bien la preuve de l'absence de facteur rhumatoïde.

Plus particulièrement, on vérifie la réactivité de ladite première substance de détection après avoir vérifié l'absence de
20 facteur rhumatoïde,

Autrement, en présence de facteur rhumatoïde, on pourrait ne détecter aucune réaction de ladite première substance de détection avec ledit troisième antigène à cause de la formation d'un complexe suivant avec le facteur rhumatoïde ($S-IgM_1-IgG$ anti
25 IgM). Toutefois, en présence des deux dites première et seconde substances de détection, on détecterait une réaction entre ledit troisième antigène et ladite seconde substance de détection par la détection du complexe ($S-IgM_1 - IgG$ anti $IgM - Ac_2$ anti IgG^{*2}).

Plus particulièrement, le dépôt d'IgG de l'espèce du patient, notamment humaines, γ -spécifique (spécifique de la chaîne gamma
30

des immunoglobulines de l'espèce du patient, notamment humaines) comme dit premier antigène permet de contrôler positivement l'introduction de l'immunoglobuline conjuguée anti-IgG au cours de la réaction sérologique ainsi que sa réactivité immunologique (aspect qualitatif). En effet, cet anticorps conjugué va se fixer également sur le dépôt d'IgG qui sera donc reconnu obligatoirement au cours de la phase de détection des IgG spécifiques de la réaction sérologique. Egalement, le dépôt d'immunoglobulines de classe M (IgM) γ -spécifiques comme dit troisième antigène par dépôt robotisé d'une solution d'IgM de l'espèce du patient, notamment humaines, γ -spécifiques pour détecter l'introduction et la réactivité immunologique (aspect qualitatif) de l'immunoglobuline conjuguée anti-IgM au cours de la réaction sérologique constitue une innovation importante car ce type de contrôle positif n'est pas systématiquement utilisé actuellement au cours des réactions sérologiques.

La présente invention permet donc la détection systématique de facteurs rhumatoïdes, et la détection systématique d'anticorps anti-nucléaires, dans un sérum utilisé pour un diagnostic sérologique par immunofluorescence indirecte, après le dépôt robotisé d'immunoglobulines de l'espèce du patient, notamment humaines, de classe G (IgG) et de cellules nucléées de l'espèce du patient, notamment humaines, sur le support de la réaction sérologique. Egalement, le dépôt robotisé d'immunoglobulines de l'espèce du patient, notamment humaines, IgG et IgM permet de contrôler la présence des anticorps secondaires anti-immunoglobulines M et respectivement G de l'espèce du patient, notamment humaines, mis en oeuvre.

Une erreur fréquente dans la réalisation des tests sérologiques, notamment pour les tests sérologiques en batterie réalisés sur un grand nombre de sérums à tester, est due à des

défauts dans l'introduction des sérums à tester, notamment par pipetage. Ces erreurs interviennent notamment dans les étapes qui impliquent le déplacement de l'échantillon à tester, notamment par pipetage, certains récipients, notamment contenant le support
5 solide sur lequel est déposé l'antigène à détecter, peuvent ne pas être remplis par inadvertance avec le sérum de l'espèce du patient, notamment humaine, à tester. Il est connu que le pipetage de sérum est entaché d'un risque d'erreurs de 1%, liée à un problème purement technique par absence de pipetage par la pipette, ou à
10 une erreur humaine par absence de pipetage par inadvertance.

Ces erreurs imposent l'introduction de contrôles dans la réalisation de la réaction. L'incorporation systématique au cours de chaque nouvelle manipulation d'un sérum témoin négatif c'est à dire ne contenant pas d'anticorps spécifiques de l'antigène à tester
15 permet d'interpréter les réactions positives. De même, l'incorporation d'un sérum témoin positif, c'est à dire contenant l'anticorps spécifique de l'antigène testé à un titre connu permet de vérifier la qualité de l'antigène et de l'immunoglobuline conjuguée.

Cependant, il n'existe actuellement aucun contrôle de ce que
20 le sérum à tester a bien été introduit dans le test sérologique. Or, si par inadvertance, le sérum à tester n'est pas introduit dans le test sérologique, la réaction antigène bactérien-anticorps sérique n'existera certainement pas, et le test sera interprété, faussement, comme négatif (faux-négatif). Dans la présente invention, on tire
25 partie de ce que la protéine A du *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré) présente une affinité pour les sérums d'origine animale, notamment le cheval, les bovins, le cochon, le lapin, le cobaye, la souris ; à un moindre degré le hamster, le rat et le mouton. En revanche, le sérum de poussin et de chèvre ne
30 réagissent pas avec la protéine A. La protéine A est un polypeptide de 42 kDa, et est un constituant de la paroi des souches de

Staphylococcus aureus, des protéines similaires mais différentes sont caractérisées à la surface des bactéries du genre *Streptococcus* [Langone J.J. Adv. Immunol. 1982, 32 : 157-251]. Cette propriété de la protéine A de *Staphylococcus aureus*, a déjà
5 été utilisée dans un test sérologique chez l'homme pour le diagnostic sérologique des endocardites infectieuses [Rolain JM, Lecam C, Raoult D. Simplified serological diagnosis of endocarditis due to *Coxiella burnetii* and *Bartonella*. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2003 ; 10 :1147-8].

10 La présente invention comprend donc l'introduction d'un contrôle d'introduction du sérum à tester au cours des réactions de sérologies bactériennes.

Pour ce faire, on introduit un antigène contenant la protéine A et notamment, introduire une bactérie *Staphylococcus aureus* à
15 titre d'antigène de contrôle que l'échantillon à tester contient bien un sérum de l'espèce du patient, notamment d'origine humaine et à détecter une réaction antigène-immunoglobuline de l'espèce du patient, notamment humaine, avec une substance spécifique.

Dans la mesure où la protéine A réagit avec des
20 immunoglobulines animales et humaines de façon non spécifique, et ce même en cas de pathologie infectieuse importante, il est possible d'utiliser cette protéine A comme contrôle positif de l'introduction d'un sérum de l'espèce du patient, notamment humaine, dans l'échantillon à tester.

25 Plus précisément, la présente invention fournit une méthode de diagnostic sérologique in-vitro dans laquelle on détecte la présence d'anticorps spécifiques d'un agent microbien infectieux dans un échantillon à tester, caractérisée en ce que l'on contrôle que ledit échantillon à tester contient un sérum de l'espèce du
30 patient, notamment humain, en détectant si des immunoglobulines

de l'espèce du patient, notamment humaines, réagissent avec un antigène contenant la protéine A d'une bactérie *Staphylococcus aureus*.

Plus particulièrement, selon la présente invention, on
5 contrôle, en préalable, que ledit échantillon testé contient bien un
sérum de l'espèce du patient, notamment humain, en détectant si
des immunoglobulines de l'espèce du patient notamment humaines,
réagissent avec un quatrième antigène contenant la protéine A
d'une bactérie *Staphylococcus aureus*, de préférence en mettant
10 en contact ledit échantillon avec un support solide sur lequel est
fixé un dit quatrième antigène, en présence d'une troisième
substance de détection qui est une substance réagissant avec une
immunoglobuline de l'espèce du patient, notamment humaine, et
pas avec ledit quatrième antigène, de préférence un anticorps anti-
15 immunoglobuline de l'espèce du patient, notamment humain, et ne
réagissant pas avec la protéine A.

Dans un mode de réalisation avantageux, ledit quatrième
antigène est une bactérie entière *Staphylococcus aureus*
comprenant la protéine A. On peut plus particulièrement utiliser les
20 bactéries *Staphylococcus aureus* déposées dans les collections
publiques telles que les bactéries déposées à l'A.T.C.C. sous le
N°29213 et à la C.N.C.M. de l'Institut Pasteur (France) sous le
numéro 65.8T comme décrit dans la publication mentionnée ci-
dessus [Rolain JM, Lecam C, Raoult D. Simplified serological
25 diagnosis of endocarditis due to *Coxiella burnetii* and *Bartonella*.
Clin. Diag. Lab. Immunol. 2003 ; 10 :1147-8].

Par ailleurs, en dehors des souches-types, toute souche
bactérienne identifiée comme *Staphylococcus aureus* peut être
utilisée comme antigène Ag₁.

Avantageusement encore, on détecte la présence d'un dit produit de la réaction avec une immunoglobuline anti-immunoglobuline de l'espèce du patient qui est une immunoglobuline d'origine animale, de préférence dans le cas d'un patient humain, une immunoglobuline de chèvre ou de poussin.

De préférence, ladite substance de détection, de préférence, le cas échéant, ladite troisième substance de détection, est une immunoglobuline animale, de préférence encore dans le cas d'un patient humain, une immunoglobuline de chèvre ou de poussin.

De préférence encore, ladite troisième substance de détection correspond à ladite première ou deuxième substance de détection et, de préférence, lesdites première et deuxième substances de détection sont une immunoglobuline d'origine animale dans le cas d'un patient humain, respectivement anti IgM ou anti IgG marquées respectivement par deux éléments de marquages différents.

Avantageusement, ladite substance de détection est un anticorps conjugué à un élément de marquage qui est une substance fluorescente. Et, en particulier, on vérifie si l'on détecte par fluorescence un complexe produit de réaction entre ledit quatrième antigène et ladite troisième substance de détection.

Avantageusement, dans une méthode de diagnostic selon l'invention, on détecte et, le cas échéant, on quantifie la dose de dite immunoglobuline de l'espèce du patient à tester de classe M ou, le cas échéant, de classe G, spécifique du dit antigène microbien dans l'échantillon à tester par lecture automatisée à l'aide d'un appareil de lecture approprié aux dits éléments de marquage.

Comme élément de marquage des dites substances de détection, on utilise donc avantageusement un marquage enzymatique, radioactif ou fluorescent, ce dernier type de marquage fluorescent étant préféré.

5 L'expression « marquage fluorescent » signifie que l'anticorps a été rendu fluorescent par couplage ou complexation avec un agent fluorescent approprié tel que l'iso(thio)cyanate de fluorescéine ou toute autre substance émettant un rayonnement détectable après son illumination, chaque substance étant
10 caractérisée par la longueur d'onde à laquelle elle doit être illuminée (longueur d'onde d'excitation) et la longueur d'onde du rayonnement qu'elle émet (longueur d'onde d'émission).

L'expression « marquage radioactif » signifie que l'anticorps porte un isotope radioactif permettant de le doser par comptage de
15 la radioactivité qui lui est associée, l'isotope pouvant être porté soit sur un élément de la structure de l'anticorps, par exemple les résidus de tyrosine constitutifs, soit sur un radical approprié qui lui a été fixé.

L'expression « marquage enzymatique » signifie que
20 l'anticorps spécifique est couplé ou complexé à une enzyme qui, associée à l'emploi de réactifs appropriés, permet une mesure quantitative de cet anticorps spécifique.

Le substrat et les réactifs sont choisis de sorte que le produit final de la réaction ou de la séquence de réactions provoquée par
25 l'enzyme et mettant en œuvre ces substances soit :

- ou bien une substance colorée ou fluorescente qui diffuse dans le milieu liquide environnant l'échantillon testé et qui fait l'objet, soit de la mesure finale spectrophotométrique ou

fluorimétrique, respectivement, soit d'une évaluation à l'œil ; éventuellement par rapport à une gamme de teintes étalonnées,

- ou bien une substance colorée insoluble qui se dépose sur l'échantillon testé et qui peut faire l'objet, soit d'une mesure photométrique par réflexion, soit d'une évaluation à l'œil, éventuellement par rapport à une gamme de teintes étalonnées.

Lorsque l'on utilise une substance de détection rendue fluorescente, la fluorescence associée à l'échantillon testé est lue directement sur un appareil approprié capable de détecter le rayonnement à la longueur d'onde d'émission et de le quantifier.

Lorsqu'on utilise une sonde radioactive, comme par exemple l'iode 125, la radioactivité associée à l'échantillon testé est complétée dans un compteur gamma selon toute modalité appropriée et par exemple après solubilisation des cellules par une solution alcaline (par exemple une solution de soude) et récupération de la solution contenant la radioactivité à l'aide d'un tampon absorbant.

Lorsque l'on utilise une enzyme comme élément de marquage sur l'anticorps de détection, l'apparition d'un produit coloré ou fluorescent est obtenue en ajoutant une solution contenant le substrat de l'enzyme et un ou plusieurs réactifs auxiliaires permettant d'obtenir finalement comme produit de réaction, soit un produit coloré soluble dans le milieu, soit un produit coloré insoluble, soit un produit fluorescent soluble, comme cela a été expliqué précédemment. On mesure ensuite le signal lumineux provenant des échantillons ainsi traités, à l'aide de l'appareillage adapté à chaque cas : photomètre en transmission, ou en réflexion ou fluorimètre respectivement. Alternativement, on peut aussi évaluer à l'œil la coloration obtenue, en s'aidant éventuellement d'une gamme de solutions colorées étalonnées.

En utilisant comme enzyme la phosphatase alcaline, le couplage de cette enzyme avec l'anticorps de détection est effectué selon la méthode proposée par Boehringer Mannheim-Biochemica. Les substrats préférentiels de cette enzyme sont le
5 paranitrophénylphosphate pour une lecture fluorométrique ou le bromo-5 chloro-4-umbelliféryl phosphate pour une lecture fluorométrique ou le bromo-5 chloro-4 indolyl-6 phosphate pour obtenir un produit de réaction coloré insoluble. On peut de même utiliser comme enzyme la β -galactosidase dont les substrats
10 préférentiels sont l'orthonitrophényl β -D-galactopyranoside ou le méthyl-4 umbelliféryl β -D-galactopyranoside.

On peut aussi coupler les anticorps de détection à la peroxydase. Dans ce cas; le procédé de couplage est dérivé de celui décrit par M.B. Wilson et P.K. Nakane in Immunofluorescence
15 and related staining techniques, W. Knapp, K. Kolubar, G. Wicks ed. Elsevier/North Holland. Amsterdam 1978, p. 215-224.

Les réactifs utilisés pour révéler la peroxydase conjuguée aux anticorps de détection contiennent de l'eau oxygénée, substrat de l'enzyme, et un chromogène approprié par exemple de
20 l'orthophénylénediamine ou l'acide azino-2-2' bis (éthyl-3 thiazoline sulfonique-6) ou ABTS pour obtenir un produit final de réaction coloré et soluble dans le milieu ou bien la diamino-3,3' benzidine ou l'amino-3 éthyl-9 carbazole ou le chloro-4 α -naphtol pour obtenir un produit final de réaction insoluble, ou bien l'acide
25 parahydroxyphényl propionique pour obtenir un produit de réaction fluorescent soluble dans le milieu.

Un autre mode de réalisation de l'invention est l'utilisation d'immunoglobuline de détection couplée à l'acétylcholinestérase.

L'acétylcholinestérase est couplée à l'anticorps en utilisant
30 préférentiellement un procédé dérivé de celui décrit dans le brevet

français n°2 550 799 ou un procédé qui comporte schématiquement la préparation de fragments de l'anticorps par une technique connue, la modification de l'enzyme par réaction avec un agent hétérobifonctionnel approprié et enfin le couplage des produits
5 ainsi obtenus. D'autres procédés connus de construction de conjugués immunoenzymatiques peuvent aussi être utilisés dans ce cas.

La révélation de l'activité enzymatique spécifiquement liée à l'antigène reconnu par le conjugué à l'acétylcholinestérase est
10 réalisée de préférence selon la technique bien connue qui emploie l'acétylthiocholine comme substrat de l'enzyme et le réactif d'Ellman, ou acide dithio-5,5' nitro-2 benzoïque comme chromogène, selon toute variante adaptée au cas examiné, par exemple celle décrite par Pradelles et al., dans Anal. Chem. 1985,
15 57 :1170-1173.

Avantageusement, dans la méthode de diagnostic selon l'invention, on détecte la présence et, le cas échéant, on dose la quantité d'immunoglobuline de classe M ou, le cas échéant, de classe G spécifique du dit antigène microbien dans ledit échantillon
20 de sérum à tester, en mettant en contact un dit antigène microbien fixé sur support solide, avec ledit échantillon de sérum contenant une dite première ou, respectivement, deuxième substance de détection réagissant spécifiquement avec la classe M ou, respectivement, la classe G d'immunoglobuline de l'espèce du
25 patient à tester spécifique du dit antigène microbien.

Avantageusement encore, ledit antigène microbien est un antigène particulaire ou corpusculaire tel que décrit précédemment, constitué de microbe entier inactivé ou fraction de microbe.

Dans un mode de réalisation particulier, ledit antigène microbien est choisi parmi des micro-organismes comprenant une bactérie, un virus, un parasite ou un champignon.

5 Plus particulièrement, ledit antigène microbien est une bactérie intracellulaire, et notamment, ledit antigène microbien est choisi parmi les bactéries du genre *Rickettsia*, *Coxiella*, *Bartonella*, *Tropheryma*, *Ehrlichia*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Treponema*, *Borrelia*, et *Leptospira*, cette liste n'étant pas exhaustive.

10 Plus particulièrement encore, ledit antigène microbien est une bactérie responsable d'une endocardite.

Dans un autre mode de réalisation, ledit antigène est un antigène microbien est un antigène viral, notamment un virus choisi parmi les virus H.I.V., C.M.V. ou Epstein-Barr, cette liste n'étant pas exhaustive.

15 Dans un mode préféré de réalisation de la méthode de diagnostic selon l'invention, on met en œuvre une pluralité d'antigènes choisis parmi lesdits premier, second, troisième et quatrième antigènes et au moins un dit antigène microbien, de préférence une pluralité d'antigènes microbiens, fixés sur un même support solide.
20

De préférence encore, au moins un dit antigène microbien et lesdits premier, deuxième et troisième et, de préférence, quatrième antigène sont fixés sur un même support solide et on utilise seulement deux substances de détection avec des éléments de
25 marquage différents, de préférence lesdites première et deuxième substances de détection étant des immunoglobulines animales, de préférence encore, dans le cas d'un patient humain, une immunoglobuline de chèvre.

Dans ce dernier mode de réalisation, un protocole de succession des contrôles est le suivant :

1) On vérifie que ledit quatrième antigène contenant la protéine A réagit avec une des substances de détection. A défaut,
5 on arrête le test, c'est-à-dire on ne prend pas en compte cet échantillon.

2) Si ledit premier antigène (IgG_1) réagit avec ladite première substance de détection (Ac_1 anti IgM^{*1}), l'échantillon de sérum comprend des facteurs rhumatoïdes , donc, là encore, on ne prend
10 pas en compte les tests de détection et de quantification des Ig M spécifiques.

3) Si ledit premier antigène ne réagit pas avec la deuxième substance de détection (Ac_2 anti IgG^{*2}), ladite deuxième substance de détection n'est pas présente ou pas réactive. On ne prend pas
15 en compte le résultat du test concernant la détection des IgG spécifiques de l'antigène microbien.

4) Si ledit premier antigène réagit avec la deuxième substance de détection, il n'y a pas de facteur rhumatoïde et ladite deuxième substance est réactive : on peut continuer le test, c'est-
20 à-dire prendre en compte les résultats sous réserve des vérifications suivantes concernant les réactions avec les deuxième, troisième et quatrième antigènes.

5) Si ledit deuxième antigène contenant un complexe ADN/histone réagit avec ladite deuxième substance de détection,
25 des anticorps antinucléaires sont présents et on ne prend pas en compte les tests de détection et de quantification des Ig G spécifiques.

6) Si le dit deuxième antigène réagit avec la dite première substance de détection, des facteurs rhumatoïdes et des anticorps antinucléaires sont présents et on arrête le test.

7) Si ledit deuxième antigène ne réagit pas, et que lesdites
5 première et deuxième substances de détection sont présentes et réactives, il n'y a pas d'anticorps anti-nucléaire, et on peut continuer sous réserve de la vérification suivante.

8) On vérifie que ledit troisième antigène réagit avec ladite première substance de détection. Si ledit troisième antigène (IgM)
10 ne réagit pas, ladite première substance n'est pas présente ou ne réagit pas, et on arrête le test.

En résumé, on ne prend en compte le résultat de la réaction avec ledit antigène microbien, que si les conditions cumulatives suivantes sont réunies :

- 15 - ledit quatrième antigène réagit,
- ledit premier antigène réagit avec ladite deuxième substance de détection,
- ledit deuxième antigène ne réagit pas, et
- ledit troisième antigène réagit avec ladite première
20 substance de détection.

La présente invention fournit également une trousse de diagnostic utile pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'invention, caractérisée en ce qu'elle comprend un dit support solide sur lequel est fixé au moins un dit premier antigène, et une
25 dite première substance de détection, et, le cas échéant, une dite deuxième substance de détection et un dit support solide sur lequel est fixé au moins un dit deuxième antigène, et le cas échéant un dit support solide sur lequel est fixée au moins un dit

troisième antigène, et le cas échéant un support solide sur lequel est fixé au moins un dit quatrième antigène.

De préférence, dans une trousse selon l'invention, l'antigène microbien et les différents dits premier, second, troisième et, de préférence quatrième antigènes sont fixés sur le même support solide, et en ce qu'elle comprend comme substance de détection lesdites première et deuxième substance de détection uniquement.

Avantageusement, dans les méthodes et trousse de diagnostic selon l'invention, on utilise comme support solide une lame de verre ou en plastique, un tube de titrage ou un puits d'une plaque de microtitrage en plastique, et plus particulièrement, comme support solide, on peut utiliser tout dispositif adapté à la manipulation de 'suspensions cellulaires et bactériennes' et notamment des tubes, des lames de verre ou de polymères, des tubes « bijoux » ou des plaques rigides de microtitration en polyéthylène, polystyrène, chlorure .

La présente invention a également pour objet une méthode de préparation d'un support solide sur lequel est fixé au moins un antigène choisi parmi un dit antigène microbien, un dit premier et, le cas échéant, un dit deuxième, troisième ou quatrième antigène permettant une détection par lecture automatisée à l'aide d'une dite première et, le cas échéant, deuxième substance de détection, utile dans une méthode selon l'invention ou une trousse selon l'invention, caractérisée en ce que l'on réalise un lavage préalable du dit support solide avec une solution d'un mélange éthanol/acétone, de préférence à 50/50, puis déposé de façon robotisée lesdits antigènes avec un robot de dépôt comprenant de préférence une seringue et on stabilise la fixation des dits antigènes par adsorption physique sur ledit support solide par un traitement avec de l'alcool, de préférence méthanol ou éthanol, alcool que l'on élimine ensuite et, de préférence, on vérifie la

fixation des dits antigènes par coloration, notamment au colorant rouge Ponceau.

On peut également utiliser un liant, comme par exemple de l'albumine sérique bovine, à une concentration finale de 1-5%, ou
5 du jaune d'œuf à une concentration finale de 1-10% pour stabiliser la fixation desdits antigènes sur ledit support solide.

La solution de prélavage permet de nettoyer le support de toute trace de substance de détection ou autre résiduelle et, notamment, éliminer toute fluorescence, tout en conservant la
10 faculté d'adsorption physique du support vis à vis des dits antigènes déposées ensuite.

Le traitement de stabilisation à l'alcool permet de stabiliser la fixation par adsorption physique aussi bien des protéines, telles que IgG et IgM, que des antigènes particuliers.

15 Avantageusement, on dépose de façon robotisée un dit antigène microbien et, le cas échéant, un dit deuxième antigène et, le cas échéant, un dit quatrième antigène, sous forme de suspension de corpuscules de cellules non confluentes ou microbes entiers, notamment bactéries ou fractions de cellules ou
20 microbes, notamment bactéries.

La détermination du lavage préalable approprié du support solide, notamment de la lame de verre a donné lieu à de nombreux essais. Ce traitement a pour objectif de nettoyer parfaitement ce support pour éliminer les artéfacts fluorescents tout en préservant
25 la fixation ultérieure des antigènes de façon compatible avec leur mode de conservation mais, aussi, en préservant sinon l'intégrité au moins la réactivité immunologique des antigènes. Il a été montré, après de nombreuses recherches infructueuses, que le rinçage et le nettoyage des lames en phase aqueuse ne permettrait

pas une fixation ultérieure des antigènes à déposer ; il en allait de même pour le rinçage à base de molécules tensio-actives comme le Tween 20. Le nettoyage avec des alcools n'était pas suffisant pour retirer la plupart des artéfacts fluorescents. C'est donc au
5 terme de ces multiples essais qu'a été optimisé un protocole de nettoyage de support solide, notamment de la lame de verre, par un mélange éthanol 50 % - acétone 50 % puis séchage à l'air.

La présente invention concerne également le dépôt d'antigènes microbiens particuliers ou corpusculaires par un robot
10 de dépôt. Selon la présente invention, les inventeurs ont mis au point, après de nombreux essais infructueux, des conditions de dépôt robotisé d'antigènes microbiens corpusculaires (microbe entier inactivé ou fraction de microbe entier inactivé) en suspension dans un milieu de dépôt. En effet, uniquement des
15 solutions homogènes d'une ou de plusieurs molécules sont actuellement déposées sur support solide par les robots de dépôt. Pour ce faire, la concentration de ces antigènes corpusculaires est calibrée avant dépôt par comptage des particules microbiennes inactivées par « fluorescence activated cell sorting (FACS-scann)
20 puis déposés de façon robotisée sur un support solide. La mise au point empirique de ces dépôts calibrés et robotisés a comporté plusieurs étapes. D'une part, plusieurs essais ont été réalisés concernant le mode de conservation le plus approprié des antigènes déposés. Après plusieurs essais infructueux, il a été mis
25 au point une conservation dans un tampon PBS-0,1 % acide de sodium à -80°C pour certains antigènes ou bien une conservation à $+4^{\circ}\text{C}$ dans l'éthanol 100 % pour d'autres antigènes (les cellules telles que cellules HL60 par exemple). Par ailleurs, plusieurs essais ont été réalisés pour déterminer la concentration optimale
30 pour chacun des antigènes testés, les concentrations infra-optimales donnant des dépôts indétectables, les concentrations supra-optimales entraînant une sédimentation des antigènes

corpusculaires en cours de dépôt et donc une variation sensible de la quantité d'antigène déposé. Enfin, les dépôts d'antigènes corpusculaires comportant de l'ADN microbien (bactérie, virus, parasites ou champignons microscopiques) sont calibrés par application d'un colorant fluorescent (molécule intercalante) dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont avantagement choisies en fonction de celles utilisées par le fluorochrome marquant les immunoglobulines conjuguées. Ce marquage fluorescent, non spécifique des antigènes peut être réalisé avant leur dépôt par le robot de dépôt ou après celui-ci. Le marqueur fluorescent est avantagement choisi pour sa stabilité à la lumière du jour.

Avantageusement les cellules sont calibrées à 10^8 cellules par millilitre.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre qui font référence aux figures 1 à 4.

La figure 1 représente la détection de dépôts robotisés de microbes de l'espèce *Staphylococcus aureus* calibrés à 10^9 bactéries / ml colorés par le colorant fluorescent Hoescht 33342 de l'exemple 1.

La figure 2 représente illustre les dépôts d'Ig M éclairés à l'aide d'un anticorps secondaire marqué de l'exemple 2, trois concentrations d'Ig M ont été déposées de haut en bas : 10 mg/ml, 1 mg/ml et 0,2 mg/ml, six dépôts ont été réalisés par concentration.

La figure 3 représente la réaction sérologique utilisant un sérum présentant des Ig G spécifiques contre *Coxiella burnetii*, des spots *Staphylococcus aureus*, IgG et *Coxiella burnetii* sont "allumés", à l'exemple 3.

La figure 4 représente une lame colorée par un colorant fluorescent, permettant de visualiser l'ensemble des 8 antigènes déposés, cellules HL60, *Staphylococcus aureus*, *Coxiella burnetii*, *Legionella pneumophila*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*,
5 *Bartonella vinsonii subsp. berkoftii*, et *Bartonella elizabethae* à l'exemple 3.

Exemple 1 : Dépôt de dits deuxième et quatrième antigènes sur support solide.

Les cellules HL60 (N° ATCC CCL 240) sont des cellules
10 fibroblastiques humaines en lignée continue utilisées pour la détection des anticorps anti-nucléaires. Après culture et production selon les protocoles habituels, on a quantifié la concentration des cellules HL 60 à l'aide d'un compteur de cellules (Microcytes® BPC / Yeast, BioDETECT AS, Olso, Norvège) et cette concentration a
15 été rapportée à 10^8 cellules / mL dans un tampon BPS stérile, pH= 7,4 pour obtenir une suspension de cellules non confluentes pouvant être déposées par robot de dépôt.

Staphylococcus aureus (n° de dépôt ATCC 29213) a été cultivé sur gélose à 5% de sang de mouton, puis récolté dans un
20 tampon PBS stérile contenant 0,1% d'azide de sodium. L'inoculum a été mesuré à l'aide du même compteur de cellules et calibré à 10^9 bactéries/mL qui est la concentration optimum compte tenu des contraintes d'absence de sédimentation en cours de dépôt et d'un dépôt en quantité suffisante de particules staphylococciques puis
25 conservé par congélation à - 80°C.

On a déposé ces cellules HL60 et des bactéries *Staphylococcus aureus* à une concentration de 10^9 CFU/mL déterminée par FACS-scan (Microcytes®) des lames en verre (Référence LLR2-45, CML, Nemours, France). Les cellules et les
30 bactéries ont été déposées sur le support solide à l'aide d'un robot

de dépôt (Arrayer 427 TM, Affymetrix, MWG Biotech SA, Courtaboeuf, France). Les dépôts ont été séchés à l'air pendant 30 minutes dans l'enceinte du "spotter", puis fixés dans un bain de méthanol à 100 % pendant 10 minutes, puis séchés à nouveau à l'air libre. L'efficacité du dépôt robotisé sur les lames, après la fixation à l'éthanol et après les bains nécessités par la réaction d'immunofluorescence indirecte suivante, a été vérifiée avec succès par la coloration par le colorant fluorescent Hoescht 333-42 qui est excité à 350 nanomètres et qui émet à 460 nanomètres (Molecular Probes). La figure 1 illustre le dépôt robotisé de 6 colonnes de 6 dépôts chacune de *Staphylococcus aureus*.

Exemple 2 : dépôt de dits premier antigène (IgG) et troisième antigène (IgM) sur support solide

Des immunoglobulines humaines de classe G γ -spécifiques (IgG) (Serotec, Cergy Saint-Christophe, France) diluées à une concentration de 5mg/mL, et des immunoglobulines de classe M γ -spécifiques (IgM (Serotec) diluées à une concentration de 10 mg/mL pour obtenir des spots bien homogènes, ont été déposées de façon robotisée à l'aide d'un robot de dépôt (modèle 427, Arrayer, Affymetrix, Inc., CA) sur un support solide constitué d'une lame de verre (Référence LLR2-45, CML, Nemours, France).

Les dépôts ont été réalisés par transfert de la suspension d'antigène d'un puit de plaque de microtitration contenant 25 μ L de suspension, sous un volume de 1 mL déposé, à 25°C et 55 % d'humidité dans l'enceinte du robot de dépôt. Ces conditions ont été contrôlées par un thermo-hygromètre. Les dépôts d'une dimension de 200 μ m ont été séchés à l'air pendant 30 minutes à 37°C dans l'enceinte du robot de dépôt, puis fixés dans un bain d'éthanol à 100% pendant 10 minutes, puis séchés à nouveau à l'air libre. L'efficacité du dépôt robotisé puis de la fixation à

l'éthanol après les bains nécessités par la réaction d'immunofluorescence indirecte a été vérifiée par la technique d'immunofluorescence indirecte.

10 sérums humains contenant des facteurs rhumatoïdes et 10
5 sérums humains ne contenant pas de facteurs rhumatoïdes (contrôles négatifs) pour l'immunodétection des facteurs rhumatoïdes, [détection qualitative par un test d'agglutination de billes de latex sensibilisées (Rhumatex Fumouze®, Laboratoires Fumouze, Levallois-Perret France)] et ont été déposés chacun sur
10 un dépôt d'IgG sous trois dilutions chacun, 1 :32, 1 :64 et 1 :128. Après un premier lavage, une réaction d'immunofluorescence indirecte a été réalisée en utilisant une immunoglobuline de chèvre (référence A-11013, Molecular Probes, Eugene, USA) à titre d'anticorps secondaire anti-IgM humaines, couplée à l'Alexa 488
15 qui est une molécule fluorescente excitée à 488 nanomètres et émettant à 540 nanomètres et en utilisant la même immunoglobuline couplée à l'Axa 594 (A-21216, Molecular Probes, Eugene, USA) qui est une molécule fluorescente excitée à 594 nanomètres et émettant à 640 nanomètres dans une deuxième
20 expérience. La lecture de la réaction a été faite au microscope à fluorescence et a montré une détection fluorescente dans tous les sérums contenant des facteurs rhumatoïdes sous forme d'un spot très brillant pour chacune des 3 dilutions testées et aucune fluorescence dans les sérums ne contenant pas ces facteurs. Cet
25 exemple illustre qu'il est possible de réaliser un dépôt robotisé d'IgG et d'IgM humaines sur un support solide dans des conditions compatibles avec la réalisation d'une réaction d'immunofluorescence indirecte pour la détection de facteurs rhumatoïdes. Egalement, cet exemple illustre qu'il est possible de
30 réaliser la détection de facteurs rhumatoïdes par une technique d'immunofluorescence indirecte.

La Figure 2 illustre les dépôts d'Ig M éclairés à l'aide d'un anticorps secondaire marqué à l'Alexa-594, trois concentrations d'Ig M ont été déposées de haut en bas : 10 mg/ml, 1 mg/ml et 0,2 mg/ml, six dépôts ont été réalisés par concentration. La concentration de 10mg/ml permet d'obtenir les spots les plus homogènes.

Exemple 3 : Un diagnostic sérologique d'infection à *Coxiella burnetii* a été réalisé selon le procédé décrit dans la présente invention

Pour la réalisation des différents tests sérologiques, 8 antigènes ont été utilisés : Cellules HL 60 (à titre de dit deuxième antigène), *Staphylococcus aureus* (à titre de dit quatrième antigène), IgG humaines (à titre de dit premier antigène) et *Coxiella burnetii* Nine Mile, phase II (N° A.T.C.C. VR 616), *Legionella pneumophila*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Bartonella vinsonii* subsp. *berkoffii*, et *Bartonella elizabethae* (à titre de dit antigènes microbiens).

Après culture et production selon les protocoles habituels, on a quantifié la concentration des cellules HL 60 à l'aide d'un compteur de cellules (Microcytes® BPC / Yeast, BioDETECT AS, Olso, Norvège) et cette concentration a été rapportée à 10^7 cellules / mL dans un tampon BPS stérile, pH= 7,4 pour obtenir une suspension de cellules non confluentes déposable par robot de dépôt. Ces cellules ont été conservées dans de l'éthanol 100 % à + 4°C avant leur dépôt robotisé.

Staphylococcus aureus a été cultivé sur gélose à 5 % de sang de mouton puis récolté dans un tampon PBS stérile contenant 0,1 % d'acide de sodium. L'inoculum a été mesuré à l'aide du même compteur de cellules et calibré à 10^9 bactéries/mL puis conservé par congélation à -80°C.

Des immunoglobulines humaines de classe G (IgG) (Serotec, Cergy Saint-Christophe, France) ont été diluées extemporanément à une concentration de 5mg/ML.

Enfin, la bactérie *Coxiella burnetii* Nine Mile phase II a été
5 cultivée sur support cellulaire et purifiée selon les protocoles
habituels et quantifiée par le compteur Microcyte® afin de
standardiser sa concentration à 10^9 bactéries/mL qui est la
concentration optimum compte tenu des contraintes d'absence de
sédimentation en cours de dépôt et d'un dépôt en quantité
10 suffisante des particules bactériennes. Cet antigène a été conservé
à -80°C dans un tampon PBS, 0,1 % acide de sodium.

Ces 4 antigènes ont été déposés sur le support solide
(Référence LLR2-45, CML, Nemours, France) à l'aide d'un robot de
dépôt (Arrayer 427 TM, Affymetrix, MWG Biotech SA, Courtaboeuf,
15 France).

Le support solide consistait en une lame de verre
préalablement nettoyée par un mélange éthanol 50 % - acétone 50
% puis séchée à l'air ambiant. Les dépôts ont été séchés à l'air
pendant 30 minutes dans l'enceinte du robot de dépôt, puis fixés
20 dans un bain de méthanol à 100 % pendant 10 minutes, puis
séchés à nouveau à l'air libre. Les dépôts ont été réalisés par
transfert de la suspension d'antigène d'un puit de plaque de
microtitration contenant 25 μL de suspension, sous un volume de 1
mL déposé, à 25°C et 55 % d'humidité dans l'enceinte du robot de
25 dépôt. Ces conditions ont été contrôlées par un thermo-
hygromètre. Les dépôts d'une dimension de 200 μm ont été séchés
à l'air pendant 30 minutes à 37°C dans l'enceinte du robot de
dépôt, puis fixés dans un bain de méthanol à 100% pendant 10
minutes, puis séchés à nouveau à l'air libre.

Pour réaliser le test sérologique, 5 sérums humains contenant des facteurs rhumatoïdes, 5 sérums humains contenant des anticorps anti-nucléaires, 10 sérums humains présentant des anticorps de type IgG anti-*Coxiella burnetii* phase II à un titre \geq 1 :200 et des anticorps de type IgM anti-*Coxiella burnetii* phase II à un titre \geq 1 :50 et 10 sérums humains témoins négatifs ne contenant aucun de ces 3 types d'anticorps ont été utilisés et ont été déposés chacun sur un dépôt d'IgG sous trois dilutions chacun, 1 :32, 1 :64 et 1 :128.

10 Après un premier lavage, une réaction d'immunofluorescence indirecte a été réalisée :

- utilisant un premier anticorps secondaire constitué d'une immunoglobuline de chèvre anti IgM humaines, couplé à l'Alexa 488 (A-11013, Molecular Probes, Eugene, USA) qui est une
15 molécule fluorescente excitée à 488 nanomètres et émettant à 540 nanomètres

- - puis un second anticorps secondaire constitué d'une immunoglobuline de chèvre anti IgG humaines couplée à l'élément de marquage Alexa 594 (A-21216, Molecular Probes, Eugene, USA) qui est une molécule fluorescente excitée à 594 nanomètres
20 et émettant à 640 nanomètres dans une deuxième expérience.

Ces réactions ont été réalisées à température ambiante, dans une enceinte humide, comportant 15 minutes d'incubation avec le sérum à tester, suivies d'un lavage au tampon PBS stérile puis
25 d'une incubation de 5 minutes avec les anticorps conjugués, avant un deuxième rinçage. La lecture des réactions a été faite au microscope à fluorescence et a donné lieu à des enregistrements numérisés des spots. Au cours de ce test, les 30 sera ou sérums humains ont "allumé" le dépôt de *S. aureus*, c'est-à-dire réagi avec
30 ledit quatrième antigène, seuls les sérums ne contenant pas de

facteurs rhumatoïdes ont "allumé" le dépôt d'IgG lors de la lecture du marqueur Alexa 488, seuls les sérums contenant des anticorps anti-nucléaires ont "allumé" le dépôt de cellules HL60, et seuls les sérums contenant des anticorps contre *C. burnetii* ont "allumé" le
5 dépôt de *C. burnetii*. Toutes les réactions utilisant les anticorps secondaires conjugués anti IgG ont "allumé" le dépôt IgG. Les titres observés d'anticorps anti-*C. burnetii* étaient concordants avec ceux retrouvés par la méthode référencée (Micro-immunofluorescence indirecte)[Dupont HT, Thirion X, Raoult D.Q
10 fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. Clin Diagn Lab Immunol. 1994;1:189-96].

La figure 3 représente la réaction sérologique utilisant un sérum présentant des IgG spécifiques contre *Coxiella burnetii* utilisant l'anticorps conjugué marqué par l'Alexa-488, les spots
15 *Staphylococcus aureus*, Ig G et *Coxiella burnetii* sont "allumés".

La figure 4 représente une lame colorée par le colorant fluorescent Hoescht 333-42 qui est excité à 350 nanomètres et qui émet à 460 nanomètres (Molecular Probes), permettant de visualiser l'ensemble de 8 antigènes déposés, cellules HL60,
20 *Staphylococcus aureus*, *Coxiella burnetii*, *Legionella pneumophila*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Bartonella vinsonii* subsp. *berkoffii*, et *Bartonella elizabethae*. Ces différents antigènes ont été déposés dans les mêmes conditions que *Coxiella*, décrites ci-dessus.

REVENDECATIONS

1. Méthode de diagnostic sérologique in vitro d'agent microbien par immunodétection dans laquelle on détecte la présence et, de préférence, on dose la quantité
5 d'immunoglobulines de patient de classe M spécifiques d'un antigène microbien caractéristique du dit agent microbien, dans un échantillon de sérum du patient à tester par détection et, de préférence, quantification d'un complexe de réaction immunologique entre ledit antigène microbien à détecter et une
10 dite immunoglobuline spécifique de classe M, à l'aide d'une première substance de détection comprenant un premier élément de marquage, de préférence un premier anticorps de marquage, ne réagissant qu'avec une dite immunoglobuline de l'espèce du patient de classe M, caractérisée en ce que l'on contrôle la
15 présence éventuelle de facteur rhumatoïde dans ledit échantillon à tester en mettant en contact ledit échantillon à tester avec un support solide sur lequel a été fixé un premier antigène correspondant à une immunoglobuline non spécifique de classe G, de préférence une immunoglobuline de l'espèce du patient, la mise
20 en contact se faisant en présence de ladite première substance de détection, et on vérifie si ladite immunoglobuline non spécifique de classe G fixée sur le support solide, a réagi avec ladite première substance de détection.

2. Méthode selon la revendication 1, dans laquelle on
25 détecte en outre et, de préférence, on dose la quantité de d'immunoglobuline de patient de classe G spécifique d'un dit antigène microbien, par détection et, de préférence, quantification d'un complexe de réaction immunologique entre ledit antigène microbien et d'une dite immunoglobuline spécifique de classe G, à
30 l'aide d'une seconde substance de détection comprenant un second élément de marquage, de préférence un second anticorps

REVENDICATIONS

1. Méthode de diagnostic sérologique in vitro d'agent microbien par immunodétection dans laquelle on détecte la présence et, de préférence, on dose la quantité
5 d'immunoglobulines de patient de classe M spécifiques d'un antigène microbien caractéristique du dit agent microbien, dans un échantillon de sérum du patient à tester par détection et, de préférence, quantification d'un complexe de réaction immunologique entre ledit antigène microbien à détecter et une
10 dite immunoglobuline spécifique de classe M, à l'aide d'une première substance de détection comprenant un premier élément de marquage, de préférence un premier anticorps de marquage, ne réagissant qu'avec une dite immunoglobuline de l'espèce du patient de classe M, caractérisée en ce que l'on contrôle la
15 présence éventuelle de facteur rhumatoïde dans ledit échantillon à tester en mettant en contact ledit échantillon à tester avec un support solide sur lequel a été fixé un premier antigène correspondant à une immunoglobuline non spécifique de classe G, de préférence une immunoglobuline de l'espèce du patient, la mise
20 en contact se faisant en présence de ladite première substance de détection, et on vérifie si ladite immunoglobuline non spécifique de classe G fixée sur le support solide, a réagi avec ladite première substance de détection.

2. Méthode selon la revendication 1, dans laquelle on
25 détecte en outre et, de préférence, on dose la quantité de d'immunoglobuline de patient de classe G spécifique d'un dit antigène microbien, par détection et, de préférence, quantification d'un complexe de réaction immunologique entre ledit antigène microbien et d'une dite immunoglobuline spécifique de classe G, à
30 l'aide d'une seconde substance de détection comprenant un second élément de marquage, de préférence un second anticorps

de marquage comprenant un second élément de marquage différent du dit premier élément de marquage, ladite deuxième substance de détection ne réagissant qu'avec une dite immunoglobuline de l'espèce du patient—de classe G caractérisée en ce que l'on contrôle la présence éventuelle d'anticorps anti-nucléaire dans ledit échantillon à tester en mettant en contact ledit échantillon à tester avec un support solide sur lequel a été fixé un deuxième antigène comprenant des complexes ADN/histones, de préférence comprenant des noyaux de cellules nucléées de l'espèce du patient, de préférence encore, tout ou partie de cellules d'origine de l'espèce du patient en lignée continue, et on vérifie si ladite deuxième substance de détection a réagi avec ledit deuxième antigène fixé sur le support solide.

3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle on détecte, la présence et, de préférence, on dose la quantité d'immunoglobulines du patient de classe G, spécifiques d'un antigène microbien caractéristique du dit agent microbien, dans un échantillon de sérum du patient à tester par détection et, de préférence, quantification d'un complexe de réaction immunologique entre ledit antigène microbien à détecter et une dite immunoglobuline spécifique de classe G, à l'aide d'une seconde substance de détection comprenant un deuxième élément de marquage, de préférence un second anticorps de marquage, ne réagissant qu'avec une dite immunoglobuline de l'espèce du patient de classe G, caractérisée en ce que l'on réalise un contrôle de la présence et de la réactivité de ladite seconde substance de détection en mettant en contact ledit support solide, sur lequel a été fixé ledit premier antigène correspondant à une dite immunoglobuline de l'espèce du patient non spécifique de classe G, avec une solution contenant un dit second anticorps de marquage anti IgG et ne contenant pas de facteur rhumatoïde, et

de marquage comprenant un second élément de marquage différent du dit premier élément de marquage, ladite deuxième substance de détection ne réagissant qu'avec une dite immunoglobuline de l'espèce du patient—de classe G caractérisée en ce que l'on contrôle la présence éventuelle d'anticorps anti-nucléaire dans ledit échantillon à tester en mettant en contact ledit échantillon à tester avec un support solide sur lequel a été fixé un deuxième antigène comprenant des complexes ADN/histones, de préférence comprenant des noyaux de cellules nucléées de l'espèce du patient, de préférence encore, tout ou partie de cellules d'origine de l'espèce du patient en lignée continue, et on vérifie si ladite deuxième substance de détection a réagi avec ledit deuxième antigène fixé sur le support solide.

3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle on détecte, la présence et, de préférence, on dose la quantité d'immunoglobulines du patient de classe G, spécifiques d'un antigène microbien caractéristique du dit agent microbien, dans un échantillon de sérum du patient à tester par détection et, de préférence, quantification d'un complexe de réaction immunologique entre ledit antigène microbien à détecter et une dite immunoglobuline spécifique de classe G, à l'aide d'une seconde substance de détection comprenant un deuxième élément de marquage, de préférence un second anticorps de marquage, ne réagissant qu'avec une dite immunoglobuline de l'espèce du patient de classe G, caractérisée en ce que l'on réalise un contrôle de la présence et de la réactivité de ladite seconde substance de détection en mettant en contact ledit support solide, sur lequel a été fixé ledit premier antigène correspondant à une dite immunoglobuline de l'espèce du patient non spécifique de classe G, avec une solution contenant un dit second anticorps de marquage anti IgG et ne contenant pas de facteur rhumatoïde, et

en vérifiant si la dite seconde substance de détection a réagi avec ledit premier antigène fixé sur le support solide.

4. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'on vérifie la réactivité de ladite deuxième substance de détection introduite dans ledit échantillon de sérum à tester, après
5 avoir vérifié l'absence de facteur rhumatoïde et d'anticorps anti-nucléaires dans ledit échantillon .

5. Méthode selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'on réalise un contrôle de la présence et de
10 la réactivité de ladite première substance de marquage qui est un anticorps anti-immunoglobuline M de l'espèce du patient, en mettant en contact un support solide sur lequel est fixée un troisième antigène correspondant à une immunoglobuline de l'espèce du patient non spécifique de classe M, avec une solution
15 contenant une dite première substance de marquage et ne contenant pas de facteur rhumatoïde, et en vérifiant si ladite première substance réagit avec ledit troisième antigène fixé sur le support solide.

6. Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce
20 que l'on vérifie la réactivité de ladite première substance de détection après avoir vérifié l'absence de facteur rhumatoïde,

7 Méthode selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'on contrôle en préalable que ledit échantillon testé contient bien un sérum de l'espèce du patient en
25 détectant si des immunoglobulines de l'espèce du patient réagissent avec un quatrième antigène contenant la protéine A d'une bactérie *Staphylococcus aureus*, de préférence en mettant en contact ledit échantillon avec un support solide sur lequel est fixé un dit quatrième antigène, en présence d'une troisième
30 substance de détection qui est une substance réagissant avec une

en vérifiant si la dite seconde substance de détection a réagi avec ledit premier antigène fixé sur le support solide.

4. Méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'on vérifie la réactivité de ladite deuxième substance de détection introduite dans ledit échantillon de sérum à tester, après
5 avoir vérifié l'absence de facteur rhumatoïde et d'anticorps anti-nucléaires dans ledit échantillon .

5. Méthode selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'on réalise un contrôle de la présence et de
10 la réactivité de ladite première substance de marquage qui est un anticorps anti-immunoglobuline M de l'espèce du patient, en mettant en contact un support solide sur lequel est fixée un troisième antigène correspondant à une immunoglobuline de l'espèce du patient non spécifique de classe M, avec une solution
15 contenant une dite première substance de marquage et ne contenant pas de facteur rhumatoïde, et en vérifiant si ladite première substance réagit avec ledit troisième antigène fixé sur le support solide.

6. Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce
20 que l'on vérifie la réactivité de ladite première substance de détection après avoir vérifié l'absence de facteur rhumatoïde,

7 Méthode selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'on contrôle en préalable que ledit échantillon testé contient bien un sérum de l'espèce du patient en
25 détectant si des immunoglobulines de l'espèce du patient réagissent avec un quatrième antigène contenant la protéine A d'une bactérie *Staphylococcus aureus*, de préférence en mettant en contact ledit échantillon avec un support solide sur lequel est fixé un dit quatrième antigène, en présence d'une troisième
30 substance de détection qui est une substance réagissant avec une

immunoglobuline de l'espèce du patient et pas avec ledit quatrième antigène, de préférence un anticorps anti-immunoglobuline de l'espèce du patient et ne réagissant pas avec la protéine A.

8 Méthode selon la revendication 7, caractérisée en ce
5 que ledit quatrième antigène est une bactérie *Staphylococcus* entière comprenant la protéine A.

9. Méthode selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que ladite substance de détection, de préférence, le cas échéant, ladite troisième substance de
10 détection, est une immunoglobuline animale, de préférence encore dans le cas d'un patient humain, une immunoglobuline de chèvre ou de poussin.

10. Méthode selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisée en ce que ladite troisième substance de détection
15 correspond à ladite première ou deuxième substance de détection et, de préférence, lesdites première et deuxième substances de détection sont une immunoglobuline d'origine animale dans le cas d'un patient humain respectivement anti IgM ou anti IgG marquées respectivement par deux éléments de marquages différents

20 11. Méthode selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que ladite substance de détection est un anticorps conjugué à un élément de marquage qui est une substance fluorescente

25 12. Méthode selon l'une des revendications 7 à 10 et selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'on vérifie si l'on détecte par fluorescence un complexe produit de réaction entre ledit quatrième antigène et ladite troisième substance de détection.

13. Méthode selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que l'on détecte la présence et, le cas échéant,

immunoglobuline de l'espèce du patient et pas avec ledit quatrième antigène, de préférence un anticorps anti-immunoglobuline de l'espèce du patient et ne réagissant pas avec la protéine A.

8 Méthode selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit quatrième antigène est une bactérie *Staphylococcus* entière comprenant la protéine A.

9. Méthode selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que ladite substance de détection, de préférence, ladite troisième substance de détection, est une immunoglobuline animale, de préférence encore dans le cas d'un patient humain, une immunoglobuline de chèvre ou de poussin.

10. Méthode selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisée en ce que ladite troisième substance de détection correspond à ladite première ou deuxième substance de détection et, de préférence, lesdites première et deuxième substances de détection sont une immunoglobuline d'origine animale dans le cas d'un patient humain respectivement anti IgM ou anti IgG marquées respectivement par deux éléments de marquages différents

11. Méthode selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que ladite substance de détection est un anticorps conjugué à un élément de marquage qui est une substance fluorescente

12. Méthode selon l'une des revendications 7 à 10 et selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'on détecte par fluorescence la présence éventuelle d'un complexe produit de réaction entre ledit quatrième antigène et ladite troisième substance de détection.

13. Méthode selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que l'on détecte la présence et, le cas échéant,

on dose la quantité d'immunoglobuline de classe M ou, le cas échéant, de classe G spécifique du dit antigène microbien dans ledit échantillon de sérum à tester, en mettant en contact ledit échantillon de sérum avec une dite première ou, respectivement, 5 deuxième substance de détection réagissant spécifiquement avec la classe M ou, respectivement, la classe G d'immunoglobuline de l'espèce du patient spécifique du dit antigène microbien, et en contact avec un dit antigène microbien fixé sur support solide.

10 14 Méthode selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que ledit antigène microbien est un antigène corpusculaire constitué de microbe entier inactivé ou une fraction de microbe.

15 15. Méthode de diagnostic sérologique selon l'une des revendication 1 à 14, caractérisée en ce que ledit agent microbien est choisi parmi des micro-organismes comprenant une bactérie, un virus, un parasite ou un champignon.

16. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 15, caractérisée en ce que ledit antigène microbien est une bactérie intracellulaire ou un virus.

20 17. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 15 ou 16, caractérisée en ce que ledit antigène microbien est choisi parmi les bactéries du genre *Rickettsia*, *Coxiella*, *Bartonella*, *Tropheryma*, *Ehrlichia*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Treponema*, *Borrelia*, et *Leptospira*.

25 18. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 17, caractérisée en ce que ledit antigène microbien est une bactérie responsable d'une endocardite.

19. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 16, caractérisée en ce que ledit antigène microbien

on dose la quantité d'immunoglobuline de classe M ou, le cas échéant, de classe G spécifique du dit antigène microbien dans ledit échantillon de sérum à tester, en mettant en contact ledit échantillon de sérum avec une dite première ou, respectivement, 5 deuxième substance de détection réagissant spécifiquement avec la classe M ou, respectivement, la classe G d'immunoglobuline de l'espèce du patient spécifique du dit antigène microbien, et en contact avec un dit antigène microbien fixé sur support solide.

14 Méthode selon l'une des revendications 1 à 13, 10 caractérisée en ce que ledit antigène microbien est un antigène corpusculaire constitué de microbe entier inactivé ou une fraction de microbe.

15. Méthode de diagnostic sérologique selon l'une des revendication 1 à 14, caractérisée en ce que ledit agent microbien 15 est choisi parmi des micro-organismes comprenant une bactérie, un virus, un parasite ou un champignon.

16. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 15, caractérisée en ce que ledit antigène microbien est une bactérie intracellulaire ou un virus.

20 17. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 15 ou 16, caractérisée en ce que ledit antigène microbien est choisi parmi les bactéries du genre *Rickettsia*, *Coxiella*, *Bartonella*, *Tropheryma*, *Ehrlichia*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Treponema*, *Borrelia*, et *Leptospira*.

25 18. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 17, caractérisée en ce que ledit antigène microbien est une bactérie responsable d'une endocardite.

19. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 16, caractérisée en ce que ledit antigène microbien

est un antigène viral choisi parmi les virus H.I.V., C.M.V. Epstein-Barr, Rougeole, Rubéole, virus des hépatites A et B

20. Méthode selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisée en ce qu'une pluralité d'antigènes choisis parmi
5 lesdits premier, second, troisième et quatrième antigènes et au moins un dit antigène microbien, de préférence une pluralité d'antigènes microbiens, sont fixés sur un même support solide.

21. Méthode selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'au moins un dit antigène microbien et lesdits premier, deuxième
10 et troisième et, de préférence, quatrième antigène sont fixés sur un même support solide et on utilise seulement deux substances de détection avec des éléments de marquage différents, de préférence lesdites première et deuxième substances de détection étant des immunoglobulines animales, de préférence dans le cas d'un patient
15 humain encore une immunoglobuline de chèvre.

22. Méthode selon la revendication 1 à 21, caractérisée en ce que l'on utilise comme support solide une lame de verre ou en plastique, un tube de titrage ou un puits d'une plaque de microtitrage en plastique.

20 23. Méthode selon l'une des revendications 1 à 22, caractérisée en ce que l'on détecte et, le cas échéant, on quantifie la dose de dite immunoglobuline de l'espèce du patient de classe M ou, le cas échéant, de classe G, spécifique du dit antigène microbien dans l'échantillon à tester par lecture automatisée à
25 l'aide d'un appareil de lecture approprié aux dits éléments de marquage.

24. Trousse de diagnostic utile pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une des revendications 1 à 23, caractérisée en ce qu'elle comprend un dit support solide sur lequel est fixé au moins

est un antigène viral choisi parmi les virus H.I.V., C.M.V. Epstein-Barr, Rougeole, Rubéole, virus des hépatites A et B

20. Méthode selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisée en ce qu'une pluralité d'antigènes choisis parmi
5 lesdits premier, second, troisième et quatrième antigènes et au moins un dit antigène microbien, de préférence une pluralité d'antigènes microbiens, sont fixés sur un même support solide.

21. Méthode selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'au moins un dit antigène microbien et lesdits premier, deuxième
10 et troisième et, de préférence, quatrième antigène sont fixés sur un même support solide et on utilise seulement deux substances de détection avec des éléments de marquage différents, de préférence lesdites première et deuxième substances de détection étant des immunoglobulines animales, de préférence dans le cas d'un patient
15 humain encore une immunoglobuline de chèvre.

22. Méthode selon la revendication 1 à 21, caractérisée en ce que l'on utilise comme support solide une lame de verre ou en plastique, un tube de titrage ou un puits d'une plaque de microtitrage en plastique.

20 23. Méthode selon l'une des revendications 1 à 22, caractérisée en ce que l'on détecte et, le cas échéant, on quantifie la dose de dite immunoglobuline de l'espèce du patient de classe M ou, le cas échéant, de classe G, spécifique du dit antigène microbien dans l'échantillon à tester par lecture automatisée à
25 l'aide d'un appareil de lecture approprié aux dits éléments de marquage.

24. Trousse de diagnostic utile pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une des revendications 1 à 23, caractérisée en ce qu'elle comprend un dit support solide sur lequel est fixé au moins

un dit premier antigène, et une dite première substance de détection, et, le cas échéant, une dite deuxième substance de détection et un dit support solide sur lequel est fixé au moins un dit deuxième antigène, et le cas échéant un dit support solide sur lequel est fixée au moins un dit troisième antigène, et le cas échéant un support solide sur lequel est fixé au moins un dit quatrième antigène.

25. Trousse de diagnostic selon la revendication 24, caractérisée en ce que l'antigène microbien et les différents dits premier, second, troisième et, de préférence quatrième antigènes sont fixés sur le même support solide, et en ce qu'elle comprend comme substance de détection lesdites première et deuxième substance de détection uniquement.

26. Méthode de préparation d'un support solide sur lequel est fixé au moins un antigène choisi parmi un dit antigène microbien, un dit premier et, le cas échéant, un dit deuxième, troisième ou quatrième antigène permettant une détection par lecture automatisée à l'aide d'une dite première et, le cas échéant, deuxième substance de détection, utile dans une méthode selon la revendication 23 ou une trousse selon l'une des revendications 24 ou 25, caractérisée en ce que l'on réalise un lavage préalable du dit support solide avec une solution d'un mélange éthanol/acétone, de préférence à 50/50, puis dépose de façon robotisée lesdits antigènes avec un robot de dépôt comprenant de préférence une seringue et on stabilise la fixation des dits antigènes par adsorption physique sur ledit support solide par un traitement avec de l'alcool, de préférence méthanol ou éthanol, alcool que l'on élimine ensuite et, de préférence, on vérifie la fixation des dits antigènes par coloration.

27. Méthode selon la revendication 24, caractérisée en ce que l'on dépose de façon robotisée un dit antigène microbien et, le

un dit premier antigène, et une dite première substance de détection, et, le cas échéant, une dite deuxième substance de détection et un dit support solide sur lequel est fixé au moins un dit deuxième antigène, et le cas échéant un dit support solide sur lequel est fixée au moins un dit troisième antigène, et le cas échéant un support solide sur lequel est fixé au moins un dit quatrième antigène.

25. Trousse de diagnostic selon la revendication 24, caractérisée en ce que l'antigène microbien et les différents dits premier, second, troisième et, de préférence quatrième antigènes sont fixés sur le même support solide, et en ce qu'elle comprend comme substance de détection lesdites première et deuxième substance de détection uniquement.

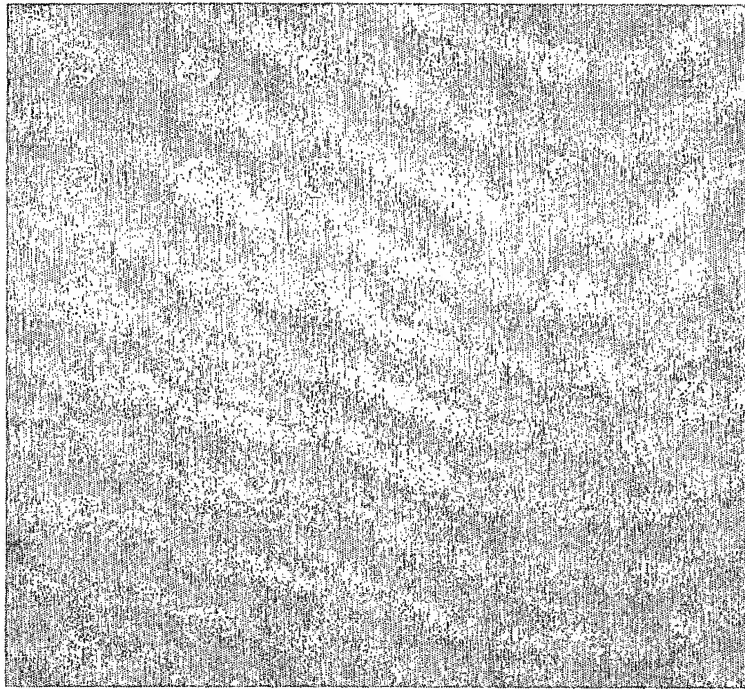
26. Méthode de préparation d'un support solide sur lequel est fixé au moins un antigène choisi parmi un dit antigène microbien, un dit premier et, le cas échéant, un dit deuxième, troisième ou quatrième antigène permettant une détection par lecture automatisée à l'aide d'une dite première et, le cas échéant, deuxième substance de détection, utile dans une méthode selon la revendication 23 ou une trousse selon l'une des revendications 24 ou 25, caractérisée en ce que l'on réalise un lavage préalable du dit support solide avec une solution d'un mélange éthanol/acétone, de préférence à 50/50, puis dépose de façon robotisée lesdits antigènes avec un robot de dépôt comprenant de préférence une seringue et on stabilise la fixation des dits antigènes par adsorption physique sur ledit support solide par un traitement avec de l'alcool, de préférence méthanol ou éthanol, alcool que l'on élimine ensuite et, de préférence, on vérifie la fixation des dits antigènes par coloration.

27. Méthode selon la revendication 26, caractérisée en ce que l'on dépose de façon robotisée un dit antigène microbien et, le

cas échéant, un dit deuxième antigène et, le cas échéant, un dit quatrième antigène, sous forme de suspension de corpuscules de cellules non confluentes ou bactéries entières ou fractions de cellules ou bactéries.

cas échéant, un dit deuxième antigène et, le cas échéant, un dit quatrième antigène, sous forme de suspension de corpuscules de cellules non confluentes ou bactéries entières ou fractions de cellules ou bactéries.

1/2



Staphylococcus aureus

Figure1



IgM 10 mg/ml

IgM 1mg/ml

IgM 0,2mg/ml

Figure 2

2/2

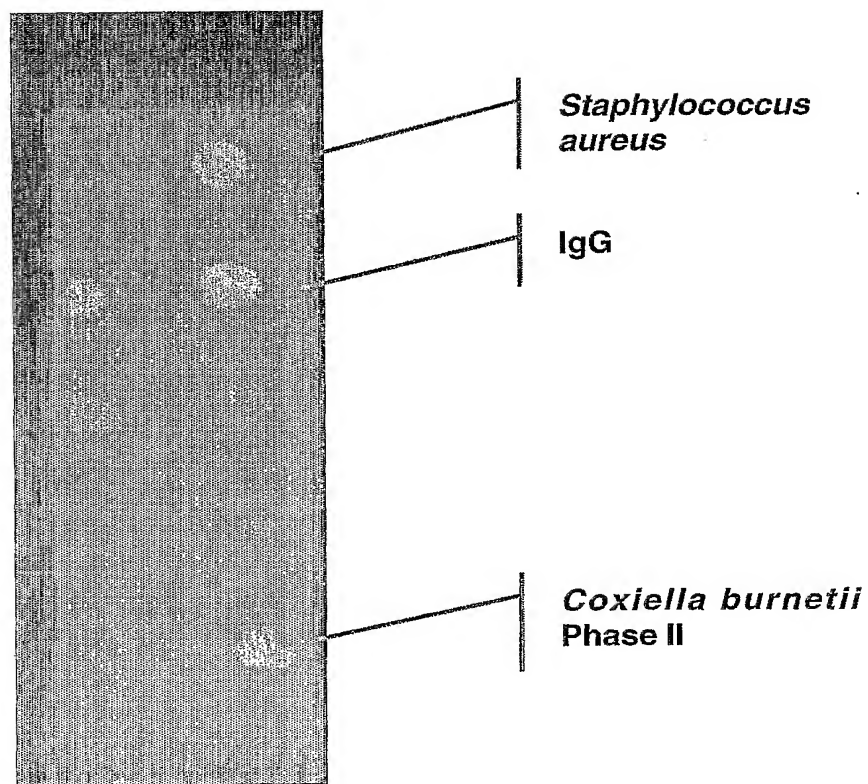


Figure 3

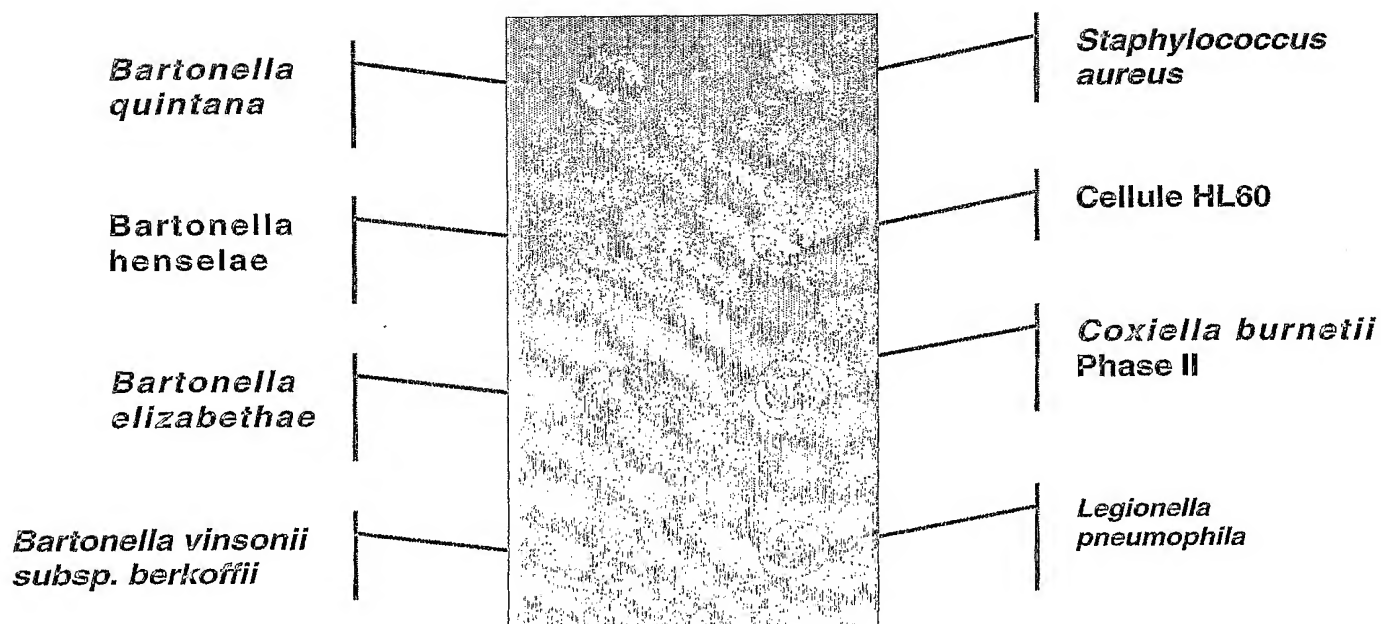


Figure 4

reçue le 10/02/04



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / .1.

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)

H 52 781 cas 1 FR/MD

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères maximum)

Méthode de diagnostic sérologique des maladies infectieuses par immunodétection d'antigène microbien comprenant le contrôle de réaction faussement positive ou négative

LE(S) DEMANDEUR(S) :

INODIAG
27 Bd Jean Moulin
Faculté Médecine de la Timone
13005 MARSEILLE
FRANCE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	ESCARGUEL
	Prénoms	Claude
	Adresse	Rue
		11 place du Coquillon
		Code postal et ville
		131110 SANARY SUR MER
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input type="checkbox"/>	Nom	
	Prénoms	
	Adresse	Rue
		Code postal et ville
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input type="checkbox"/>	Nom	
	Prénoms	
	Adresse	Rue
		Code postal et ville
	Société d'appartenance (facultatif)	

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

Gérard PORTAL

CPI n° 92-1203

